

DERWENT-ACC-NO: 1993-070187
DERWENT-WEEK: 200043
COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Amide cpd. prodn. useful for industrial
applications - by converting
nitrile into corresp. amide using microorganism or enzyme
e.g. Candida
guilliermondii, klebsiella pneumoniae sub species, etc.

PATENT-ASSIGNEE: DAICEL CHEM IND LTD[DAIL]

PRIORITY-DATA: 1991JP-0198559 (July 12, 1991)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE
PAGES	MAIN-IPC	
JP 3076631 B2	August 14, 2000	N/A
014	C12P 013/02	
JP 05015384 A	January 26, 1993	N/A
004	C12P 013/02	

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO
APPL-DATE		
JP 3076631B2	N/A	1991JP-0198559
July 12, 1991		
JP 3076631B2	Previous Publ.	JP 5015384
N/A		
JP 05015384A	N/A	1991JP-0198559
July 12, 1991		

INT-CL_(IPC): C12P013/02; C12P013/02 ; C12R001:01 ;
C12P013/02 ;
C12R001:22 ; C12P013/02 ; C12R001:72 ; C12P013/02 ;
C12R001:465 ;
C12P013/02 ; C12R001:58 ; C12P013/02 ; C12R001:425 ;
C12P013/02 ;
C12R001:18 ; C12P013/02 ; C12R001:37 ; C12P013/02 ;
C12R001:01 ;
C12P013/02 ; C12R001:22 ; C12P013/02 ; C12R001:72 ;
C12P013/02 ;
C12R001:465 ; C12P013/02 ; C12R001:425 ; C12P013/02 ;
C12R001:18 ;
C12P013/02 ; C12R001:37

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 05015384A

BASIC-ABSTRACT: Prodn. comprises converting nitrile into corresp. amide by using a microorganism or enzyme and sepg. out resultant amide.

The microorganism or enzyme is at least one selected from Streptomyces, Klebsiella, Serratia, Erwinia, Tukamurella, Gordona, Morganella, Proteus, Enterobacter, Microascus, Candida or Pantoea genus.

Candida guilliermondii NH-2 strain (FERM p-11350) is the microorganism which hydrolyses nitrile to convert amine to amide. Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae NH-36 T2 strain (FERM p-11739) is another microorganism which hydrolyses nitrile to convert amine to amide. Pantoea agglomerans NH-3 strain (FERM p-11349) is another microorganism which hydrolyses nitrile to convert amine to amide.

USE- Amide cpds. are useful in various industries. For example, acrylamide is useful as macromolecular cpds. agglutination agent, paper strength-increasing agent, and fibre-modifier; methacrylamide is used in the field of paints, adhesive, light crosslinking material due to its characteristics such as hydrophilicity, oleophilicity and excellent heat resistance and crosslinking property; further nicotinamide is useful as material for vitamins and pyrazineamide is useful as material for pharmaceutic

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS:

AMIDE COMPOUND PRODUCE USEFUL INDUSTRIAL APPLY CONVERT
NITRILE CORRESPOND AMIDE
MICROORGANISM ENZYME CANDIDA GUILLIERMONDII KLEBSIELLA
PNEUMONIA SUB SPECIES

DERWENT-CLASS: A41 B05 D16 E19

CPI-CODES: A01-D06; B04-B02B1; B04-B02B2; B07-D04B;
B10-D03; D05-C; D05-H04;
D05-H05; E07-D04B; E07-D10; E10-D03C; E11-M;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 *05*

Fragmentation Code

M423 M710 M903 Q120 Q233 V500 V540 V550

Chemical Indexing M2 *01*

Fragmentation Code

H7 H714 H721 J0 J011 J3 J371 M210 M212 M262
M281 M320 M416 M720 M903 M904 M910 N131 N132 N134
N235 N331 N343 N411 Q120 Q233

Specific Compounds

00444P

Chemical Indexing M2 *02*

Fragmentation Code

H7 H714 H721 J0 J011 J3 J371 M210 M211 M212
M262 M273 M281 M320 M416 M720 M903 M904 M910 N131
N132 N134 N235 N331 N343 N411 Q120 Q233

Specific Compounds

01490P

Chemical Indexing M2 *03*

Fragmentation Code

F013 F431 J0 J011 J3 J311 M280 M320 M413 M510
M521 M530 M540 M720 M903 M904 M910 N131 N132 N134
N235 N331 N343 N411 Q120 Q233

Specific Compounds

00678P

Chemical Indexing M2 *04*

Fragmentation Code

F012 F551 J0 J011 J3 J311 M280 M320 M413 M510
M521 M530 M540 M720 M903 M904 N131 N132 N134 N235
N331 N343 N411 Q120 Q233

Specific Compounds

12330P

Chemical Indexing M3 *01*

Fragmentation Code

H7 H714 H721 J0 J011 J3 J371 M210 M212 M262
M281 M320 M416 M720 M903 M904 M910 N131 N132 N134
N235 N331 N343 N411 Q120 Q233

Specific Compounds

00444P

Chemical Indexing M3 *02*

Fragmentation Code

H7 H714 H721 J0 J011 J3 J371 M210 M211 M212
M262 M273 M281 M320 M416 M720 M903 M904 M910 N131
N132 N134 N235 N331 N343 N411 Q120 Q233

Specific Compounds

01490P

Chemical Indexing M3 *03*

Fragmentation Code

F013 F431 J0 J011 J3 J311 M280 M320 M413 M510
M521 M530 M540 M720 M903 M904 M910 N131 N132 N134
N235 N331 N343 N411 Q120 Q233

Specific Compounds

00678P

Chemical Indexing M3 *04*

Fragmentation Code

F012 F551 J0 J011 J3 J311 M280 M320 M413 M510
M521 M530 M540 M720 M903 M904 N131 N132 N134 N235
N331 N343 N411 Q120 Q233

Specific Compounds

12330P

UNLINKED-DERWENT-REGISTRY-NUMBERS: 0444P; 0678P ; 1490P

POLYMER-MULTIPUNCH-CODES-AND-KEY-SERIALS:

Key Serials: 0030 0226 0229 0619 0624 0626 0631 2016 2020

2065 2069 2179 2189

2206 2600 2682 2792 2798 3248 3250

Multipunch Codes: 014 03- 074 076 077 086 244 263 295 343

360 58- 723 014 02&

074 076 077 086 231 331 353 473 50& 52& 532 533 534 535 541

609 656 657 688

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1993-030881

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-15384

(43)公開日 平成5年(1993)1月26日

(51)IntCl⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 P 13/02

6977-4B

// (C 1 2 P 13/02

C 1 2 R 1:01)

(C 1 2 P 13/02

C 1 2 R 1:22)

審査請求 未請求 請求項の数4(全 14 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平3-198559

(22)出願日

平成3年(1991)7月12日

(71)出願人 000002901

ダイセル化学工業株式会社

大阪府堺市鉄砲町1番地

(72)発明者 二階堂 輝之

新潟県新井市諏訪町2-1-14

(72)発明者 小林 良則

新潟県上越市国府3-13-11

(74)代理人 弁理士 畝田 充生

(54)【発明の名称】 アミド化合物の製造方法および新規な微生物

(57)【要約】

【目的】 微生物の作用により、ニトリルからアミド化合物を高い選択性及び効率で製造する。

【構成】 ストレプトマイセス (Streptomyces) 属、クレブシエラ (Klebsiella) 属、セラチア (Serratia) 属、エルビニア (Erwinia) 属、ツカムレラ (Tukamurella) 属、ゴルドナ (Gordona) 属、モルガネラ (Morganella) 属、プロテウス (Proteus) 属、エンテロバクター (Enterobacter) 属、ミクロアスカス (Microascus) 属、キャンディダ (Candida) 属およびパントエア (Pantoea) 属に属し、かつニトリルを水和する能力を有する微生物又酵素をニトリルに作用させる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ニトリルを、微生物又は酵素の作用により対応するアミドに変換し、生成したアミドを分離するアミドの製造方法において、前記微生物又は酵素が、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、エルビニア (*Erwinia*) 属、ツカムレラ (*Tukamurella*) 属、ゴルドナ (*Gordona*) 属、モルガネラ (*Morganella*) 属、プロテウス (*Proteus*) 属、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属、ミクロアスカス (*Microascus*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、およびパントエア (*Pantoea*) 属に属し、かつニトリルを水和する能力を有する微生物群から選ばれた少なくとも一種の微生物、又はこれらの微生物の酵素であることを特徴とするアミド化合物の製造方法。

【請求項2】 ニトリルを水和しアミドに変換する微生物が、キャンディダグイリエモンディ (*Candida guilliermondii*) NH-2株 (微工研菌寄第11350号) である新規な微生物。

【請求項3】 ニトリルを水和しアミドに変換する微生物が、パントエアアグロメランス (*Pantoea agglomerans*) NH-3株 (微工研菌寄第11349号) である新規な微生物。

【請求項4】 ニトリルを水和しアミドに変換する微生物が、クレブシエラニューモニアエ サブスピーシズ ニューモニアエ (*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*) NH-36 T2株 (微工研菌寄第11739号) である新規な微生物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アミド化合物を微生物学的に製造する方法、およびニトリルをアミドに変換する新規な微生物に関する。

【0002】

【従来の技術と発明が解決しようとする課題】 アミド化合物は、産業上、有用な物質が多い。例えば、アクリルアミドは高分子凝集剤、紙力増強剤、および繊維改質剤などに利用され、メタクリルアミドは、適度な親水性、親油性および優れた耐熱性、架橋性などの特徴を生かして、塗料、接着剤、光架橋性材料などに利用されている。さらに、ニコチンアミドはビタミン原料として、ピラジンアミドは医薬原料として有用である。

【0003】 近年、微生物又は微生物より抽出した酵素の作用を利用して、ニトリルからアミドを製造するいくつかの方法が提案されている。例えば、主に脂肪族ニトリルを水和する微生物として、バチルス (*Bacillus*) 属、バクテリジウム (*Bacteridium*) 属、ミクロコッカス (*Micrococcus*) 属、又はブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属に属する微生物 (特公昭62-21519号公報)、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ノル

918号公報)、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物 (特公昭59-37951号公報) などが提案されている。また、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属に属する微生物により、芳香族または複素環式ニトリルを水和する方法も提案されている (特開平2-470号公報)。

【0004】 一方、ニトリルの構造が複雑化する程、微生物の水和活性、アミドへの変換効率が小さくなる。

【0005】 従って、本発明の目的は、反応活性及び選択性が高く、構造が複雑であってもニトリルからアミド化合物を効率よく工業的に有利に製造できる方法を提供することにある。

【0006】 また、本発明の他の目的は、構造が複雑であってもニトリルに対応するアミドに高い選択性及び効率で変換できる新規な微生物を提供することにある。

【0007】

【発明の構成】 本発明者らは、微生物による水和方法に着目し、簡便かつ高い反応収率と高い選択性で、ニトリルからアミドを生物学的に製造できる方法を鋭意検討した結果、ニトリルヒドラターゼを産生し、かつ活性の高い特定の微生物が、複雑な構造を有するニトリルをも効率よく水和し、アミドを生成することを見だし、本発明を完成した。

【0008】 すなわち、本発明は、ニトリルを、微生物又は酵素の作用により対応するアミドに変換し、生成したアミドを分離するアミドの製造方法において、前記微生物又は酵素が、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、エルビニア (*Erwinia*) 属、ツカムレラ (*Tukamurella*) 属、ゴルドナ (*Gordona*) 属、モルガネラ (*Morganella*) 属、プロテウス (*Proteus*) 属、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属、ミクロアスカス (*Microascus*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、およびパントエア (*Pantoea*) 属に属し、かつニトリルを水和する能力を有する微生物群から選ばれた少なくとも一種の微生物、又はこれらの微生物の酵素であるアミド化合物の製造方法を提供する。

【0009】 また、本発明は、ニトリルを水和しアミドに変換する微生物が、キャンディダグイリエモンディ (*Candida guilliermondii*) NH-2株 (微工研菌寄第11350号)、パントエア アグロメランス (*Pantoea agglomerans*) NH-3株 (微工研菌寄第11349号)、またはクレブシエラ ニューモニアエ サブスピーシズ ニューモニアエ (*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*) NH-36 T2株 (微工研菌寄第11739号) である新規な微生物を提供する。

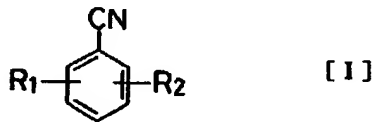
【0010】 本発明において水和反応に付されるニトリルには、広い範囲のニトリル、例えば、脂肪族ニトリル、芳香族ニトリル、複素環式ニトリルなどが含まれ

【0011】脂肪族ニトリルとしては、炭素数2～6の飽和又は不飽和ニトリル、例えば、アセトニトリル、プロピオニトリル、ブチロニトリル、イソブチロニトリル、バレロニトリル、イソバレロニトリル、カプロニトリルなどの飽和モノニトリル類；マロニトリル、サクシノニトリル、アジボニトリルなどの飽和ジニトリル類； α -アミノプロピオニトリル、 α -アミノメチルチオブチロニトリル、 α -アミノブチロニトリル、アミノアセトニトリルなどの α -アミノニトリル類；ラクトニトリル、ヒドロキシアセトニトリル、 α -ヒドロキシ- γ -メチルチオブチロニトリルなどの α -ヒドロキシニトリル類；アミノ-3-ピロピオニトリルなどの β -アミノニトリル類；アクリロニトリル、メタクリロニトリルなどの不飽和ニトリル類が挙げられる。

【0012】芳香族ニトリルには、例えば、下記一般式【I】又は【II】

【0013】

【化1】



(式中、R₁ 及び R₂ は、同一又は異なって、水素原子、ハロゲン原子、メチル基、ヒドロキシ基、メトキシ基、アミノ基、又はニトロ基を示す)

【0014】

【化2】



で表される化合物が含まれる。

【0015】前記一般式【I】で表される化合物には、例えば、ベンゾニトリル、*o*-、*m*-および*p*-クロロベンゾニトリル、*o*-、*m*-および*p*-フルオロベンゾニトリル、*o*-、*m*-および*p*-ニトロベンゾニトリル、*p*-アミノベンゾニトリル、4-シアノフェノール、*o*-、*m*-および*p*-トルニトリル、2、4-ジクロロベンゾニトリル、2、6-ジクロロベンゾニトリル、2、6-ジフルオロベンゾニトリル、アニソニトリルなどの芳香族モノニトリル類；フタロニトリル、イソフタロニトリル、テレフタロニトリルなどの芳香族ジニトリルなどが含まれる。一般式【II】で表される芳香族ニトリルには、例えば、 α -ナフトニトリル、 β -ナフトニトリルなどが含まれる。

【0016】また、芳香族ニトリルには、例えば、シアニ化ベンジルなども含まれる。

【0017】複素環式ニトリルには、例えば、下記一般式【III】【IV】【V】又は【VI】で表される化合物が含まれる。

【化3】



(式中、Xは、硫黄原子又は酸素原子を示す)

【0019】

【化4】



10 【0020】

【化5】



【0021】

【化6】



20

前記一般式【III】で表される化合物としては、例えば、2-チオフェンカルボニトリル、2-フロニトリルなどが挙げられる。

【0022】前記一般式【IV】【V】で表される化合物としては、例えば、2-シアノピリジン、3-シアノピリジン、4-シアノピリジン、シアノピラジンなどが挙げられる。

【0023】一般式【VI】で表される化合物には、例えば、5-シアノインドールが含まれる。

30 【0024】複素環式ニトリルには、前記以外のニトリル、例えば、シアノピペリジン、シアノピペラジンなどの水素化された複素環式ニトリル、縮合複素環式ニトリルも含まれる。

【0025】なお、ニトリルが複数のシアノ基を有する場合、少なくとも1個のシアノ基がアミド基に変換されればよい。

【0026】本発明の製造方法で使用する微生物または酵素は、構造が複雑な複素環式ニトリルに対しても水和活性および選択性が高い。

40 【0027】本発明において使用される微生物は、ストレプトマイセス (Streptomyces) 属、クレブシエラ (Klebsiella) 属、セラチア (Serratia) 属、エルビニア (Erwinia) 属、ツカムレラ (Tukamurella) 属、ゴルドナ (Gordona) 属、モルガネラ (Morganella) 属、プロテウス (Proteus) 属、エンテロバクター (Enterobacter) 属、ミクロアスカス (Microascus) 属、キャンディダ (Candida) 属、およびパントエア (Pantoea) 属に属する微生物群から選ばれ、かつニトリルを水和し、アミドを生成する能力を有する限り、特に制限されない。

ては、例えば、ストレプトマイセスアルボグリセルス (*Streptomyces albogriseolus*) HUT 6045、ストレプトマイセス クリゾマルス (*Streptomyces chrysomallus*) HUT 6141、ストレプトマイセス シネレオルバー (*Streptomyces cinereouruber*) HUT 6142、ストレプトマイセス チアスタチカス (*Streptomyces diastaticus*) HUT 6116、ストレプトマイセス オリバセウス (*Streptomyces olivaceus*) HUT 6061、ストレプトマイセス ルブロシアノチアスタチカス (*Streptomyces rubrocyandasticus*) HUT 6117などが挙げられる。

【0029】クレブシエラ属に属する微生物としては、例えば、クレブシエラ ニュウモニアエ (*Klebsiella pneumoniae*) IFO 12019、IFO 3319、IFO 12059、IAM 1063、クレブシエラ ニュウモニアエ サブスピーシズ ニュウモニアエ (*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*) NH-36 T2株などが挙げられる。

【0030】セラチア属に属する微生物の具体例としては、例えば、セラチア ピリムシカ (*Serratia plymuthica*) IFO 3055、セラチア マルセッセンス (*Serratia marcescens*) IAM 1105などが挙げられる。

【0031】エルビニア属に属する微生物には、例えば、エルビニア キャロットボラ (*Erwinia carotovora*) IFO 3057などが含まれる。

【0032】ツカムレラ属に属する微生物には、例えば、ツカムレラ ポーロメタボラム (*Tukamurella paurometabolum*) JCM 3226などが含まれる。ゴルドナ属に属する微生物には、例えば、ゴルドナ ルプロベルチンクタス (*Gordona rubropertinctus*) JCM 3227などが含まれる。

【0033】モルガネラ属に属する微生物には、例えば、モルガネラ モルガニ (*Morganella morganii*) IFO 3848などが含まれる。

【0034】プロテウス属に属する微生物には、例えば、プロテウス ブルガリス (*Proteus vulgaris*) IFO 3167などが含まれる。

【0035】エンテロバクター属に属する微生物には、例えば、エンテロバクター エアロジェネス (*Enterobacter aerogenes*) IFO 12010などが含まれる。

【0036】ミクロアスカス属に属する微生物には、例えば、ミクロアスカス デスモスポラス (*Microascus desmosporus*) IFO 6761などが含まれる。

【0037】キャンディダ属に属する微生物には、例えば、キャンディダ グイリエモンディー (*Candida guilliermondii*) NH-2株などが含まれる。

【0038】パントエア属に属する微生物には、例えば、パントエア アグロメラン (*Pantoea agglomeran*

【0039】前記微生物は、野生株、変種株、または、細胞融合もしくは遺伝子操作法などの遺伝的手法により誘導される組み換え株など、いずれの株であってもよい。また、これらの微生物は、少なくとも一種使用すればよい。

【0040】なお、IFO番号の付された微生物は、(財)醗酵研究所(IFO)発行の「List of Cultures、第8版、第1巻(1988)」に記載されており、該IFOから入手できる。IAM番号の付された微生物は東京大学応用微生物学研究所から入手できる。JCM番号の付された微生物は、理化学研究所 系統微生物保存機関発行の「Catalogue of strains 第4版(1989)」に記載されており、理化学研究所 系統微生物保存機関より入手できる。HUT番号の付された微生物は、日本微生物保存連盟(JFCC)発行の「Catalogue of Cultures、第4版(1987)」に記載されており、広島大学工学部から入手できる。

【0041】また、キャンディダ グイリエモンディー NH-2株、およびパントエアアグロメラン NH-3株、クレブシエラ ニュウモニアエ サブスピーシズニュウモニアエ NH-36 T2株は、本発明者らが自然界より分離したもので、アミド生成能の強い菌株であり、それぞれ、微工研菌寄第11350号(FERM P-11350)、微工研菌寄第11349号(FERM P-11349)、微工研菌寄第11739号(FERM P-11739)として工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている。以下に、それらの菌学的性質を示す。

【0042】キャンディダ グイリエモンディ NH-2株

(1)形態

コロニー：半透明でクリーム色がかった白色、光沢がある。縁は完全で、仮性菌糸がまばらにある。

【0043】分芽胞子：小さめで、楕円形

有性生殖の有無：なし

(2)C源およびN源の同化

嫌氣的：グルコース	+
好氣的：グルコース	+
ガラクトース	+
ソルボース	+
ラムノース	+
ズルシトール	+
イノシトール	-
マンニトール	+
ソルビトール	+
グリセリン	+
エリスリトール	-
D-アラビノース	+
L-アラビノース	+

7		8	
D-キシロース	+	(14) デンプンの加水分解	陰性
L-キシロース	-	(15) ゼラチンの加水分解	陰性
アドニトール	+	(16) カゼインの加水分解	陰性
α -メチルグルコシド	+	(17) DNAの加水分解	陰性
サリシン	+	(18) Tween 80の加水分解	陰性
セロビオース	+	(19) エクスリンの加水分解	陽性
マルトース	+	(20) チロシンの分解	陰性
ラクトース	-	(21) 3% KOHによる溶菌	陽性
メリビオース	+	(22) 酸素に対する態度	通性嫌気
シュクロース	+	10 性	
トレハロース	+	(23) 37℃での生育	する
イヌリン	-	(24) 41℃での生育	しない
メレジトース	+	(25) pH 5.6での生育	する
ラフィノース	+	(26) Mac-Conkey-Agar 培地での生育	する
デンプン	-	(27) SS-Agar 培地での生育	する
キシリトール	+	(28) Cetrimid-Agar 培地での生育	しない
グルコン酸	-	(29) 色素の生成	黄色
2-ケト-グルコン酸	+	非拡散性	あり
5-ケト-グルコン酸	-	拡散性	なし
硝酸塩	-	20 蛍光性	なし
(3) 30℃での生育	+	ピロシアニン	なし
37℃での生育	+	(30) OFテスト	F
(4) 4-シアノピリジンの水和	+	(31) グルコースからガスの生成	-
以上の菌学的性質をN. J. W. Kreger-van Rij による		(32) 糖から酸の生成	
“The Yeasts, a taxonomic study” 第3版 (1984) に		グルコース	+
従って分類し、NH-2株をキャンディダ グイリエモ		フラクトース	+
ンディ (<i>Candida guilliermondii</i>) と同定した。		キシロース	+
【0044】バントエア アグロメランス NH-3株		ラムノース	+
(a) 形態		シュクロース	+
(1) 細胞の形および大きさ	桿菌	30 L-アラビノース	+
0.5~0.7 μ × 1.2~2.5 μ		メリビオース	+
(2) 細胞の多形性の有無	なし	トレハロース	+
(3) 運動性	あり	ガラクトース	+
(4) 胞子の有無	なし	ラクトース	-
(5) グラム染色性	陰性	ラフィノース	-
(6) 鞭毛	周鞭毛	リボース	+
(b) 生理学的性質		マンノース	+
(1) オキシダーゼ	陰性	マルトース	-
(2)カタラーゼ	陽性	セロビオース	+
(3) アミノペプチダーゼ	陽性	40 メリジトース	-
(4) 硫化水素の生成	陰性	アミグダリン	+
(5) インドールの生成	陰性	アドニトール	-
(6) VPテスト	陰性	イノシトール	-
(7) 硝酸塩の還元	陰性	マンニトール	+
(8) クエン酸の利用 (Simons')	陽性	ズルシトール	-
(9) ウレアーゼ	陰性	ソルビトール	-
(10) フェニルアラニンデアミナーゼ	陽性	エリスリトール	-
(11) マロン酸の利用	陽性	アラビトール	+
(12) シュクロースからレバンの生成	陰性	サリシン	+

グリセリン	+
エスクリン	+
メチル-D-グルコシド	-
(33)ONPG (β-ガラクトシダーゼ)	陽性
(34)アルギニンジヒドロラーゼ	陰性
(35)リジンデカルボキシラーゼ	陰性
(36)オルニチンデカルボキシラーゼ	陰性
(37)4-シアノピリジンの水和	+
以上の菌学的性質を、バージーの細菌分類書 [Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986)] に基づいて分類すると、NH-3株は、エンテロバクター アグロメランス (<i>Enterobacter agglomerans</i>) と同定されるが、同種と、エルビニア ヘルビコラ (<i>Erwinia herbicola</i>)、エルビニア ミレティアエ (<i>Erwinia milletiae</i>) の一部の種は、最近、パントエア アグロメランス (<i>Pantoea agglomerans</i>) として再分類することが提案されており、広く支持されている [Gaviniら、Int. J. Syst. Bacteriol. 39, 337-45 (1989)]。そこで、本菌の特徴を、彼らに従って検討し、NH-3株を <i>Pantoea agglomerans</i> と同定した。	
【0045】クレブシエラ ニュウモニアエ サブスピーシーズ ニュウモニアエNH-36 T2株	
(a)形態	
(1)細胞の形および大きさ	桿菌
0.5~0.7μ×1.2~3.0μ	
(2)運動性	なし
(3)グラム染色性	陰性
(4)胞子の有無	なし
(b)生理学的性質	
(1)オキシダーゼ	陰性
(2)カタラーゼ	陽性
(3)アミノペプチダーゼ (Cerny)	陽性
(4)インドールの生成	陰性
(5)VPテスト	陽性
(6)硝酸塩の還元	陽性
(7)脱窒反応	陽性
(8)クエン酸の利用 (Simons')	陽性
(9)ウレアーゼ	陽性
(10)フェニルアラニンデアミナーゼ	陰性
(11)マロン酸の利用	陽性
(12)シュクロースからレバンの生成	陰性
(13)レシチナーゼ	陰性
(14)デンブンの加水分解	陽性
(15)ゼラチンの加水分解	陰性
(16)カゼインの加水分解	陰性
(17)DNAの加水分解	陰性
(18)Tween 80の加水分解	陰性
(19)エクスリンの加水分解	陽性
(20)3%HOHによる溶菌	陽性

性	
(22)37℃での生育	+
(23)41℃での生育	+
(24)pH5.6での生育	+
(25)Mac-Conkey-Agar 培地での生育	+
(26)SS-Agar 培地での生育	+
(27)Cetrimid-Agar 培地での生育	+
(28)色素の生成	
非拡散性	陰性
10 拡散性	陰性
蛍光性	陰性
ピロシアニン	陰性
(29)OFテスト	F
(30)酸の生成	
グルコース	+
フラクトース	+
キシロース	+
ラムノース	+
シュクロース	+
20 L-アラビノース	+
メリビオース	+
トレハロース	+
ラクトース	+
ラフィノース	+
マンノース	+
マルトース	+
セロビオース	+
メリジトース	-
アドニトール	-
30 エリスリトール	-
イノシトール	+
マンニトール	+
ズルシトール	+
ソルビトール	+
サリシン	+
グリセリン	+
(31)ONPG (β-ガラクトシダーゼ)	陽性
(32)アルギニンジヒドロラーゼ	陰性
(33)リジンデカルボキシラーゼ	陽性
40 (34)オルニチンデカルボキシラーゼ	陰性
(35)4-シアノピリジンの水和	+
(36)グルコースからガスの生成	+
以上の菌学的性質を、前記バージーの細菌分類書に基づいて分類すると、NH-36 T2株は、クレブシエラ ニュウモニアエ サブスピーシーズ ニュウモニアエと同定された。	
【0046】本発明で使用する微生物は、適当な酵素誘導源の存在下に培養するのが望ましい。酵素誘導源としては、例えば、クロトノニトリル、クロトンアミド、ア	

トリル、プロピオンアミド、アセトアミド、イソバレロニトリル、*n*-ブチロニトリル、イソブチロニトリル、*n*-カプロニトリル、*n*-ブチルアミド、イソブチルアミド、*n*-カプロアミド、メタアクリロニトリル、メタアクリルアミド、*n*-バレルアミド、イソバレロアミド、ベンゾニトリル、ベンズアミド、2-シアノピリジン、3-シアノピリジン、4-シアノピリジン、ピコリンアミド、ニコチンアミド、イソニコチンアミドなどのニトリルおよびアミドなどが挙げられる。これらの酵素誘導源は少なくとも一種使用できる。

【0047】培地としては、前記酵素誘導源を含む慣用の培地、例えば、(1) 前記酵素誘導源を唯一の窒素源または窒素源・炭素源とし、これにリン酸塩、ナトリウム、カリウム、鉄、マグネシウム、マンガン、亜鉛、コバルトなどの無機栄養源；ビチオン、チアミンなどのビタミン類などを適宜含有する培地、(2) グルコース、フルクトース、シュクロース、デキストリン、デンプンなどの糖類、ソルビトール、エタノール、グリセロールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、酢酸、プロピオン酸などの有機酸類およびその塩類、パラフィンなどの炭化水素類などから選択された少なくとも一種の炭素源；硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウムなどの窒素源；酵母エキス、麦芽エキス、ペプトン、肉エキスなどの有機栄養源；前記酵素誘導源となるニトリル及び／又はアミドなどの炭素源・窒素源；前記の無機栄養源、ビタミン類などを適宜含有した培地などが挙げられる。

【0048】このような酵素誘導源を含む培地で前記微生物を培養することにより、ニトリルに対して水和活性を示す菌体を取得できる。

【0049】培地のpHは、微生物の生育が阻害されない範囲、例えば、通常5~9、好ましくはpH6~8程度であり、培養温度は、通常20~50℃、好ましくは25~37℃である。前記微生物の培養は、例えば、前記培地で1~5日間に亘り好氣的に行うことができる。

【0050】本発明の反応には、ニトリルを、前記微生物、その処理物または微生物から分離したニトリルヒドラーゼ酵素により水和し、対応するアミドに変換させる全ての態様が含まれる。具体的には、例えば、次の通りである。

【0051】(1) ニトリルの存在下で微生物を培養する方法、(2) 培養した菌体培養物で、ニトリルを水和する方法、(3) 菌体培養物から採取した菌体で、ニトリルを水和する方法、(4) 菌体培養物から採取した菌体の処理物、例えば菌体の破砕物で、ニトリルを水和する方法、(5) 培養菌体から分離したニトリルヒドラーゼ酵素で、ニトリルを非生物学的に水和する方法、(6) 培養菌体またはニトリルヒドラーゼ酵素を常法により担体に固定化し、ニトリルを水和する方法など。

【0052】菌体培養物からの菌体の採取は、慣用の方

た、菌体の破砕も、例えば、ホモジナイザーなどにより機械的に行なうことができる他、超音波などを用いて行なうこともできる。

【0053】本発明の方法において、反応に悪影響を及ぼさない溶媒、例えば、水；生理食塩水；pH7~9程度のリン酸緩衝液などの緩衝液；アルコールなどの有機溶媒と水との混液中に、微生物菌体または菌体処理物を懸濁させ、ニトリルを共存させることにより、温和な条件下で速かに水和反応が進行し、対応するアミドが生成する。反応系の微生物菌体または菌体処理物の濃度は、通常、0.1~10重量%程度、ニトリルの濃度は、通常、0.1~10重量%程度である。反応は、例えば、温度0~40℃程度、pH5~10程度、反応時間2分~24時間程度で行なうことができる。

【0054】なお、反応に際して、基質であるニトリルの反応系内の濃度は、反応を阻害しない程度の濃度、例えば、2重量%以下にコントロールしつつ逐次添加することが望ましい。さらに、反応系のpHは、前記緩衝液により、または水酸化ナトリウム、アンモニアなどの塩基性化合物を添加することにより、pH7~9程度にコントロールするのが好ましい。

【0055】このようにして生成したアミドは、慣用の方法により分離精製できる。例えば、反応液を、直接、膜分離、抽出、減圧濃縮、晶析、遠心分離などの分離手段に供したり、反応液から菌体を遠心分離、膜分離などによって除去した後、前記分離手段に供する方法などにより、目的化合物であるアミドを分離することができる。なお、分離精製に際しては、任意の段階で、活性炭、イオン交換樹脂などで処理して着色物質、不純物などを除去してもよい。

【0056】

【発明の効果】本発明の製造方法は、反応活性および選択性が極めて高く、構造が複雑であってもニトリルからアミド化合物を効率よく工業的に有利に製造できる。また、本発明の新規な微生物は、構造が複雑であってもニトリルを対応するアミド化合物に高い選択性および効率で変換する。

【0057】

【実施例】以下に、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0058】実施例1

表1に示す培地5mlを、φ21mmの試験管に入れ、滅菌した後、表2に示す菌株をそれぞれ植菌し、30℃で72時間振盪培養した。

【0059】

【表1】

13
表1

グリセリン	10 g/L
NaCl	1 g/L
KH ₂ PO ₄	2 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg/L
CoCl ₂ · 4H ₂ O	10 mg/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1 mg/L
MnCl ₂ · 4H ₂ O	7 mg/L
酵母エキス	0.2 g/L
イソバレロニトリル	2 g/L
脱イオン水	残部
pH	7.2

培養終了後、遠心分離により菌体を分離し、生菌体を得た。培養生菌体の全量を、50mMカリウムリン酸緩衝*

表 2

14

*液 (pH8.0) 0.5mlに懸濁し、懸濁液に0.2 Mカリウムリン酸緩衝液 (pH8.0) 0.25ml、4-シアノピリジン水溶液 (0.25ml) を加え、30℃で24時間反応させた。反応終了後、遠心分離機で菌体を除去し、得られた上清について、下記高速液体クロマトグラフィーによりピリジン-4-カルボキサミドを定量した。得られた結果を表2に示す。なお、高速液体クロマトグラフィーによる反応生成物の定量は、下記の条件で行なった。

10 【0060】カラム：ユニシルバック5C₁₈ (φ4.6 × 250mm、ガスクロ工業製)

移動相：40mMカリウムリン酸緩衝液 (pH2.5) : CH₃CN=3 : 1

ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 含有量3 g/L

流速：1.2 ml/分

温度：室温

検出波長：205 nm

【0061】

【表2】

微生物名	反応収率 (%)
ストレプトマイセス アルボグリセルス IUT 6045	19.0
ストレプトマイセス クリソマルス IUT 6141	11.5
ストレプトマイセス シネレオルバー IUT 6142	11.0
ストレプトマイセス ザアスタチカス IUT 6116	18.0
ストレプトマイセス オリバセウス IUT 6061	20.0
ストレプトマイセス ルプロシアノザアスタチカス IUT 6117	13.0
ツカムレラ ポーロメタボラム JCM 3226	13.0
ゴールドナ ルプロベルチンクタス JCM 3227	14.5
クレブシエラ ニューモニアエ IFO 12019	12.5
クレブシエラ ニューモニアエ IFO 3319	66.5
クレブシエラ ニューモニアエ IFO 12059	61.5
クレブシエラ ニューモニアエ IAM 1063	44.5
プロテウス ブルガリス IFO 3167	17.5
モルガネラ モルガニ IFO 3848	15.0
セラチア ビリムシカ IFO 3055	35.0
セラチア マルセッセンス IAM 1105	15.0
エンテロバクター エアロジェネス IFO 12010	65.5
エルビニア キャロトボラ IFO 3057	71.5
ミクロアスカス デスモスポラス IFO 6761	11.0
キャンディダ グイリモンディ NH-2	43.0
バントエア アグロメランス NH-3	64.6

実施例2

表1に示す培地1500mlを、容量2.6Lの小型培養槽(丸菱バイオエンジニア製)に入れ、滅菌した後、エンテロバクター エアロジェネス (*Enterobacter aerogenes*) IFO 12010を植菌した。温度30℃、攪拌速度450rpm、0.5vvmの通気の条件で72時間培養した。

【0062】培養終了後、遠心分離にて菌体を分離し、50mMカリウムリン酸緩衝液(pH8.0)300mlに菌体を懸濁し、4-シアノピリジン3gを加えて、温度30℃、攪拌速度100rpmの条件で24時間反応したところ、ピリジン-4-カルボキサミドは6.9g/Lの濃度で生成した。

【0063】反応液から遠心分離にて菌体を除去した後、上清を減圧濃縮し、得られた濃縮液を100mlのn-ブタノールにて3回抽出を行ない、n-ブタノール層を合わせ、減圧下に濃縮し、冷却することにより、ピリジン-4-カルボキサミド1.2gが得られた。

【0064】実施例3

表3に示す組成の培地5mlを、φ21mmの試験管に入れ、滅菌した後、エンテロバクター エアロジェネス (*Enterobacter aerogenes*) IFO 12010株、エルビニア キャロトボラ (*Erwinia carotovora*) IFO 3057株、ゴルドナ ルプロベルチンクタス (*Gordona rubropertinctus*) JCM 3227株、クレブシエラ ニュウモニアエ (*Klebsiella pneumoniae*) IFO 3319株、およびクレブシエラ ニュウモニアエ サブスピーシズ ニュウモニアエ (*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*) NH-36 T2株をそれぞれ白金耳植菌し、30℃で24時間振盪培養した。

【0065】

【表3】

表 3

肉エキス	10g/L
ポリペプトン	10g/L
NaCl	5g/L
脱イオン水	残部
pH	7.3

次いで、NH-36 T2株を除く4種の培養液を前記表1に示す滅菌済の培地(100ml/500ml容坂口フラスコ)に、またNH-36 T2株の培養液を表4に示す滅菌済の培地(100ml/500ml容坂口フラスコ)に、それぞれ1ml植菌し、30℃で72時間振盪培養した。

【0066】

【表4】

16
表 4

グリセリン	10g/L
NaCl	1g/L
KH ₂ PO ₄	2g/L
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.2g/L
FeSO ₄ ・7H ₂ O	10mg/L
CoCl ₂ ・4H ₂ O	10mg/L
CaCl ₂ ・2H ₂ O	1mg/L
MnCl ₂ ・4H ₂ O	7mg/L
ビオチン	1mg/L
塩酸チアミン	1mg/L
イソバレロニトリル	2g/L
脱イオン水	残部
pH	7.2

培養終了後、遠心分離により菌体を集菌した後、50mMカリウムリン酸緩衝液(pH8.0)に菌体を懸濁し、菌体濃度を光学濃度OD₆₆₀=4に調整した。菌体懸濁液0.25ml、表5に示す4%のニトリル基質液0.25ml、200mMカリウムリン酸緩衝液0.25ml、および蒸留水0.25mlからなる混合液を10℃で1時間静置し反応させた。なお、前記混合液中の基質濃度は1%、菌体濃度はOD₆₆₀=1である。反応混合液に2.5%リン酸1mlを添加して反応を停止した後、遠心分離し、上清を適当な倍率で希釈し、下記の条件で高速液体クロマトグラフィーにより、生成したアミドを定量した。

【0067】高速液体クロマトグラフィーの条件

(1) アミドがピコリンアミド、ニコチンアミド、イソニコチンアミドおよびピラジニアミドである場合

カラム: Wakosil 5C₁₈ (φ4.6×150mm、和光純薬工業製)

移動相: 40mMカリウムリン酸緩衝液(pH2.5): CH₃CN=7:3

SDS含有量3g/L

流速: 1.0ml/分

温度: 室温

検出波長: 254nm

(2) アミドがベンズアミド、2-チオフェンカルボキサミドおよびm-トルアミドである場合

カラム: Wakosil 5C₁₈ (φ4.6×150mm、和光純薬工業製)

移動相: 40mMカリウムリン酸緩衝液(pH2.5): CH₃CN=3:2

流速: 1.0ml/分

温度: 室温

検出波長: 254nm

に対する活性を100%として表示した。

【0068】

【表5】表5より、試験に供した菌株は、いずれも高い水和活性を示す。特にNH-36 T2株は、各種のニトリルに対する水和活性が著しく高い。

【0069】実施例4

実施例3で用いた菌株のうちNH-36 T2株を除く4種の菌株を、実施例3と同様にして培養し、遠心分離により集菌した後、50mMカリウムリン酸緩衝液(pH8.0)に菌体を懸濁し、菌体濃度をOD₆₆₀ = 8に調整した。

【0070】次いで、表6に示すように、4種類のニトリル基質濃度1%、菌体濃度OD₆₆₀ = 1~4の混合液を調製し、50mMカリウムリン酸緩衝液(pH8.0)中で、混合液1mlを10℃で4時間反応させた。反応混合液に2.5%リン酸1mlを添加して反応を停止した後、遠心分離した。上清中に生成したアミドを、実施例1と同様の高速液体クロマトグラフィーの分析条件で定量した。なお、脂肪族アミドの場合には、下記のガスクロマトグラフィーの分析条件で、生成したアミドを定量した。

【0071】ガスクロマトグラフィーの条件

カラム：ボラパックQ 80~100メッシュ、φ2.6mm×2.1m

He：40cm³/分

検出：水素炎イオン化検出器(FID)

カラム温度：210~250℃

結果を表6に示す。なお、相対活性は、ピリジン-4-カルボキサミドの生成量(モル)を1として、各アミドの生成量(モル)から算出した。

【0072】

【表6】表6より、試験に供した菌株は各種のニトリルに対して高い水和活性を示す。

【0073】実施例5

NH-36 T2株を、実施例3と同様にして培養し、遠心分離により集菌した後、50mMカリウムリン酸緩衝液(pH8.0)に菌体を懸濁し、菌体濃度をOD₆₆₀ = 2に調整した。得られた菌体懸濁液0.25ml、200mMカリウムリン酸緩衝液0.25ml、および表7に示す9種類の2%ニトリル基質溶液0.5mlを混合し、10℃で30分間静置し反応させた。なお、反応終了時の基質濃度は1%、菌体濃度はOD₆₆₀ = 0.5とした。反応混合液に2.5%リン酸1mlを添加して反応を停止した後、実施例4と同様にして、生成したアミドを定量した。結果を表7に示す。

【0074】

【表7】

表 7

基 質	アミド生成量 (mM)	相 対 活 性
4-シアノピリジン	4.3	1.0
アセトニトリル	11.1	2.6
プロピオニトリル	109.7	25.9
アクリロニトリル	103.0	24.2
メタクリロニトリル	49.5	11.6
ブチロニトリル	91.9	21.6
イソブチロニトリル	74.0	17.4
バレロニトリル	67.5	15.9
カプロニトリル	7.7	1.8

表7より、NH-36 T2株はニトリルに対して著しく高い水和活性を示す。

表 5

菌 株	IFO 12010		IFO 3057		JCM 3227		IFO 3319		NH-36 T2	
	生成アミド (mM)	相対活性 (%)	生成アミド (mM)	相対活性 (%)	生成アミド (mM)	相対活性 (%)	生成アミド (mM)	相対活性 (%)	生成アミド (mM)	相対活性 (%)
2-シアノピリジン	0.67	105	0.18	58	0.16	76	0.22	76	10.46	251
3-シアノピリジン	0.13	20	0.22	71	0.14	67	0.10	34	4.73	114
4-シアノピリジン	0.25	39	0.27	87	0.15	71	0.86	297	7.57	182
シアノピラジン	0.19	30	0.24	77	0.16	76	0.15	52	9.17	220
ベンゾニトリル	0.64	100	0.31	100	0.21	100	0.29	100	4.16	100
2-チオフェン カルボニトリル	0.17	27	0.24	77	0.13	62	0.10	34	11.62	279
m-トリニトリル	0.24	38	0.24	77	0.20	95	0.22	76	8.39	202

表 6

菌 株	IFO 12010		IFO 3319		IFO 3057		JCM 3227	
反応時の菌体濃度OD ₆₈₀	2		4		4		1	
基 質	アミド生成量 (mM)	相対活性	アミド生成量 (mM)	相対活性	アミド生成量 (mM)	相対活性	アミド生成量 (mM)	相対活性
4-シアノピリジン	41.8	1.0	52.3	1.0	0.6	1.0	11.3	1.0
アクリロニトリル	186.1	4.5	134.1	2.6	7.4	13.4	129.4	11.5
メタクリロニトリル	173.5	4.2	118.0	2.3	2.9	5.2	48.1	4.3
ブチロニトリル	173.4	4.2	155.1	3.0	8.9	16.2	80.9	7.2

【手続補正書】

【提出日】平成3年9月19日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正内容】

【0011】脂肪族ニトリルとしては、炭素数2～6の

ロビオニトリル、ブチロニトリル、イソブチロニトリル、バレロニトリル、イソバレロニトリル、カプロニトリルなどの飽和モノニトリル類；マロニトリル、サクシノニトリル、アジポニトリルなどの飽和ジニトリル類； α -アミノプロピオニトリル、 α -アミノメチルチオブチロニトリル、 α -アミノブチロニトリル、アミノアセトニトリルなどの α -アミノニトリル類；ラクtonニトリル

メチルチオブチロニトリルなどの α -ヒドロキシニトリル類；アミノ-3-アロピオニトリルなどの β -アミノニトリル類；アクリロニトリル、メタクリロニトリルなどの不飽和ニトリル類が挙げられる。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0044

【補正方法】変更

【補正内容】

【0044】パントエア アグロメランズ NH-3株

(a)形態

(1)細胞の形および大きさ	桿菌
0.5~0.7 μ ×1.2~2.5 μ	
(2)細胞の多形性の有無	なし
(3)運動性	あり
(4)胞子の有無	なし
(5)グラム染色性	陰性
(6)鞭毛	周鞭毛
(b)生理学的性質	
(1)オキシダーゼ	陰性
(2)カタラーゼ	陽性
(3)アミノペプチダーゼ	陽性
(4)硫化水素の生成	陰性
(5)インドールの生成	陰性
(6)VPテスト	陰性
(7)硝酸塩の還元	陰性
(8)クエン酸の利用 (Simons')	陽性
(9)ウレアーゼ	陰性
(10)フェニルアラニンデアミナーゼ	陽性
(11)マロン酸の利用	陽性
(12)シュクロースからレバンの生成	陰性
(13)レシチナーゼ	陰性
(14)デンプンの加水分解	陰性
(15)ゼラチンの加水分解	陰性
(16)カゼインの加水分解	陰性
(17)DNAの加水分解	陰性
(18)Tween 80の加水分解	陰性
(19)エクスリンの加水分解	陽性
(20)チロシンの分解	陰性
(21)3%KOHによる溶菌	陽性
(22)酸素に対する態度	通性嫌気性
(23)37℃での生育	+
(24)41℃での生育	-
(25)pH5.6での生育	+
(26)Mac-Conkey-Agar 培地での生育	+
(27)SS-Agar 培地での生育	+
(28)Cetrimid-Agar 培地での生育	-
(29)色素の生成	黄色

拡散性

蛍光性

ピロシアニン

(30)OFテスト

(31)グルコースからガスの生成

(32)糖から酸の生成

グルコース

フラクトース

キシロース

ラムノース

シュクロース

L-アラビノース

メリビオース

トレハロース

ガラクトース

ラクトース

ラフィノース

リボース

マンノース

マルトース

セロビオース

メリジトース

アミグダリン

アドニトール

イノシトール

マンニトール

ズルシトール

ソルビトール

エリスリトール

アラビトール

サリシン

N-アセチルグルコサミン

グリセリン

エスクリン

メチル-D-グルコシド

(33)ONPG (β -ガラクトシダーゼ)

(34)アルギニンジヒドロラーゼ

(35)リジンデカルボキシラーゼ

(36)オルニチンデカルボキシラーゼ

(37)4-シアノピリジンの水和

以上の菌学的性質を、バージーの細菌分類書 [Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986)] に基づいて分類すると、NH-3株は、エンテロバクター アグロメランズ (*Enterobacter agglomerans*) と同定されるが、同種と、エルビニア ヘルビコラ (*Erwinia herbicola*)、エルビニア ミレティアエ (*Erwinia milletiae*) の一部の種は、最近、パントエア アグロメランズ (*Pantoea agglomerans*) として再分類することが提案されており、広く支持されている [Gaviniら、Int. J.

陰性

陰性

陰性

F

-

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

-

-

+

+

-

+

-

-

-

-

+

-

-

+

+

+

+

+

-

陽性

陰性

陰性

陰性

+

菌の特徴を、彼らに従って検討し、NH-3株をPantoea agglomerans と同定した。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0059

【補正方法】変更

【補正内容】

【0059】

【表1】培養終了後、遠心分離により菌体を分離し、生菌体を得た。培養生菌体の全量を、50mMカリウムリン酸緩衝液(pH8.0)0.5mlに懸濁し、懸濁液に0.2Mカリウムリン酸緩衝液(pH8.0)0.25ml、4-シアノピリジン水溶液(0.25ml)を加え、30℃で24時間反応させた。反応終了後、遠心分離機で菌体を除去し、得られた上清について、下記高速液体クロマトグラフィーによりイソニコチンアミドを定量した。得られた結果を表2に示す。なお、高速液体クロマトグラフィーによる反応生成物の定量は、下記の条件で行なった。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0060

【補正方法】変更

【補正内容】

【0060】カラム：ユニシルバック5C₁₈(φ4.6×250mm、ガスクロ工業製)

移動相：40mMカリウムリン酸緩衝液(pH2.5)：CH₃CN=7：3

ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)含有量3g/L

流速：1.0ml/分

温度：室温

検出波長：254nm

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0066

【補正方法】変更

【補正内容】

【0066】

【表4】培養終了後、遠心分離により菌体を集菌した後、50mMカリウムリン酸緩衝液(pH8.0)に菌体を懸濁し、菌体濃度を光学密度OD₆₆₀=4に調整した。菌体懸濁液0.25ml、表5に示す4%のニトリル基質液0.25ml、200mMカリウムリン酸緩衝液0.25ml、および蒸留水0.25mlからなる混合液を10℃で1時間静置し反応させた。なお、前記混合液中の基質濃度は1%、菌体濃度はOD₆₆₀=1である。反応混合液に2.5%リン酸1mlを添加して反応を停止した後、遠心分離し、上清を適当な倍率で希釈し、下記の条件で高速液体クロマトグラフィーにより、生成したアミドを定量した。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0073

【補正方法】変更

【補正内容】

【0073】実施例5

NH-36 T2株を、実施例3と同様にして培養し、遠心分離により集菌した後、50mMカリウムリン酸緩衝液(pH8.0)に菌体を懸濁し、菌体濃度をOD₆₆₀=2に調整した。得られた菌体懸濁液0.25ml、200mMカリウムリン酸緩衝液0.25ml、および表7に示す9種類の2%ニトリル基質溶液0.5mlを混合し、10℃で30分間静置し反応させた。なお、反応終了時の基質濃度は1%、菌体濃度はOD₆₆₀=0.5である。反応混合液に2.5%リン酸1mlを添加して反応を停止した後、実施例4と同様にして、生成したアミドを定量した。結果を表7に示す。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
(C12P 13/02				
C12R 1:72)				
(C12P 13/02				
C12R 1:465)				
(C12P 13/02				
C12R 1:425)				
(C12P 13/02				
C12R 1:18)				
(C12P 13/02				
C12R 1:37)				